

# EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NEUROMUSCULAR NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS: ANÁLISE MORFOMÉTRICA E METABÓLICA

## EFFECTS OF NEUROMUSCULAR ELECTRIC STIMULATION ON RATS' SOLEUS MUSCLE: A MORPHOMETRIC AND METABOLIC ANALYSIS

JOÃO LUIZ QUAGLIOTTI DURIGAN<sup>1</sup>, KARINA MARIA CANCELLIERO<sup>2</sup>, RINALDO ROBERTO DE JESUS GUIRRO<sup>3</sup>, CARLOS ALBERTO DA SILVA<sup>3</sup>, MARIA LUIZA OZORES POLACOW<sup>3</sup>

### RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da estimulação elétrica neuromuscular (EE) fásica sobre os parâmetros morfométrico e metabólico do músculo sóleo de ratos, nos períodos de 3, 7 e 15 dias. Ratos *Wistar* foram divididos em 4 grupos (n=5): controle (C), EE por 3 dias (EE-3), 7 dias (EE-7) e 15 dias (EE-15). Foram analisado o conteúdo de glicogênio, massa muscular, área das fibras e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ). Com relação à massa muscular, ocorreu aumento significativo no EE-15 de 11,55% comparado ao C. O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou alterações significativas no EE-3 quando comparado ao C. Já o EE-7 e EE-15 demonstraram aumento significativo de 74,19% e 80,64%, respectivamente, comparados ao C. Na análise morfométrica, ocorreu aumento significativo no EE-15 de 16,23% em relação ao C. A densidade do tecido conjuntivo intramuscular não apresentou alterações significativas em todos os grupos submetidos à EE quando comparados com o C. A EE promoveu aumento das reservas de glicogênio nos períodos de 7 e 15 dias, bem como aumento na massa muscular, área das fibras e nas reservas de glicogênio no período de 15 dias.

**Descritores:** *Terapia por estimulação elétrica; Ratos Wistar; Morfologia; Metabolismo; Fisioterapia.*

**Citação:** Durigan JLQ, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA, Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular no músculo sóleo de ratos: análise morfométrica e metabólica. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2008; 16(4): 238-241. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

### INTRODUÇÃO

Os programas de fortalecimento muscular são procedimentos importantes e muito utilizados na clínica fisioterapêutica. Além da reabilitação, há outros objetivos para se produzir hipertrofia muscular, como o fator estético, bem como para se ter um melhor rendimento esportivo.

A estimulação elétrica neuromuscular (EE) tornou-se um importante recurso para a produção de hipertrofia muscular, especialmente após os relatos do médico russo Yakov Kots em 1977 apud Kramer et al.<sup>(1)</sup> que a EE podia produzir ganhos de força em atletas de elite em valores de 30 a 40% maiores do que aqueles produzidos pela contração voluntária máxima do músculo.

Embora os seus protocolos experimentais não fossem bem documentados e seus resultados nunca puderam ser reproduzidos no ocidente, seus relatos contribuíram para ampliar os estudos da relação entre a EE e o fortalecimento muscular. Desde então, os

### SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effect of phasic neuromuscular electric stimulation (ES) on morphometric and metabolic parameters of rats' soleus muscles for 3, 7 and 15 days. Wistar rats were divided into four groups (n=5): control (C), ES for 3 days (ES-3), ES for 7 days (ES-7) and ES for 15 days (ES-15). Glycogen content, muscle mass, fibers area and area fraction of the intramuscular connective tissue were assessed. The statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey ( $p < 0.05$ ).

Regarding muscle mass, there was a significant increase in ES-15 (11.55%) compared to C. The glycogen content didn't show significant changes in ES-3 when compared to C. ES-7 and ES-15 showed the significant increase of 74.19% and 80.64%, respectively, compared to C. In the morphometric analysis, a significant increase in ES-15 (16.23%) compared to C was found. The area fraction of the intramuscular connective tissue didn't present significant changes in all groups submitted to ES when compared to C. The ES fostered an increase of the glycogen content in 7 and 15 days, as well as increased muscle mass, fibers area and glycogen content in 15 days.

**Keywords:** *Electric stimulation therapy; Rats Wistar; Morphology; Metabolism; Physiotherapy.*

**Citation:** Durigan JLQ, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA, Polacow MLO. Effects of neuromuscular electric stimulation on rats' soleus muscle: a morphometric and metabolic analysis. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2008; 16(4): 238-241. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

estudos desenvolvidos parecem dar suporte à afirmação que esse recurso pode fortalecer músculos tanto de indivíduos saudáveis<sup>(2,3)</sup> quanto aos submetidos à condição de desuso muscular<sup>(3,4)</sup>.

No âmbito da experimentação com animais, a maioria dos estudos envolvendo a EE utilizou protocolos crônicos, ou seja, por longos períodos, além de eletrodos implantados. Esses estudos demonstraram que o recurso predispõe mudança das fibras rápidas (IIB) para lenta (IIA e I), aumento da resistência à fadiga com redução da sua tensão tetânica, aumento da densidade dos capilares e perfusão, além do aumento do conteúdo de mioglobinas e das células satélites<sup>(5,6)</sup>.

Além disso, o aumento da atividade contrátil quer seja pela atividade física constante ou pela EE, promove a translocação de uma população de transportadores (GLUT4) insensíveis à insulina até a membrana melhorando a captação da glicose pelos músculos<sup>(7)</sup>.

Trabalho realizado na Universidade Metodista de Piracicaba, SP - Brasil.

Endereço para correspondência: Rua Major José Inácio, 2400 - Centro. CEP: 13560-161 - São Carlos - SP-Brasil - E-mail: joaodurigan@gmail.com

1. Professor Doutor do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal da Paraíba
2. Professora Doutora do Departamento de Fisioterapia da Faculdade Anhanguera de Piracicaba
3. Professor Doutor PPG da Universidade Metodista de Piracicaba

Artigo recebido em 13/08/07 aprovado em 24/01/08

Apesar dos diversos trabalhos que abordaram a EE aplicada de forma crônica, a literatura é escassa com relação à sua aplicação em curtos períodos (fásica). Nesse contexto, Noronha et al.<sup>(8)</sup> não observaram transformações no tipo de fibra, bem como hipertrofia no músculo tibial anterior de ratos estimulados em dias alternados com eletrodos de superfície (6 minutos, 3x/semana, 8 semana). Por outro lado, foi demonstrado aumento significativo na síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas avaliadas após 3 horas de estimulação (100 Hz, T<sub>ON</sub>: 3s, T<sub>OFF</sub>: 10s, eletrodos implantados, durante 20 minutos) no músculo sóleo e extensor longo dos dedos de ratos<sup>(9)</sup>.

Embora existam alguns estudos em animais indicando que a EE pode produzir fortalecimento, hipertrofia muscular e alterações metabólicas, a forma de estimulação empregada pode ser um problema clínico, inviabilizando sua aplicação em humanos, uma vez que estes trabalhos utilizaram protocolos de EE crônicos (semanas e até meses) e/ou eletrodos implantados.

Pautado na observação que são escassos os trabalhos com animais que indiquem transformação estrutural e metabólica por meio da EE, mimetizando os parâmetros que são utilizados em humanos, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da EE fásica sobre os parâmetros morfométrico e metabólico no músculo sóleo de ratos, nos períodos de 3, 7 e 15 dias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos *Wistar* (3 a 4 meses, 250-300g) foram mantidos sob condições controladas de biotério, recebendo água e ração *ad libitum* e tratados segundo recomendações do Guide for Care Use of Laboratory Animals<sup>(10)</sup>. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 010/2006).

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5): controle (C), estimulação elétrica durante 3 dias (EE-3), 7 dias (EE-7) e 15 dias (EE-15).

Após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg peso), o membro posterior esquerdo foi tricotomizado e a EE foi realizada em sessão diária de 20 minutos, por um período de 3, 7 e 15 dias. Um eletrodo foi colocado na região inguinal e o outro sobre o músculo tríceps sural. Os parâmetros da estimulação elétrica foram: frequência de 10 Hz, fase de 0,4 ms e pulso quadrático bifásico. A intensidade da corrente foi padronizada em 5,0 mA, a partir da visualização da contração muscular, sendo acrescida de 1,0 mA a cada 5 minutos, com objetivo de manter uma contração efetiva durante todo o período da sessão. Os eletrodos de silicone-carbono apresentavam área de 1cm<sup>2</sup> cada.

Após o período experimental, as análises realizadas foram: conteúdo de glicogênio do músculo sóleo, além da massa, área das fibras e densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular.

Para a determinação do glicogênio muscular seguiu-se a proposta descrita por Lo et al.<sup>(11)</sup>, que consta da digestão das amostras musculares em KOH 30% a 100°C e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm (rotação por minuto) durante 15 minutos e o glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol. Os valores foram expressos em mg/100mg de peso úmido.

Para a análise morfométrica do músculo sóleo, o seu segmento ventral foi fixado em solução tamponada de formalina e o material foi processado em parafina obtendo-se vários cortes transversais não seriados de 7µm de espessura, que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Foi utilizado um sistema de análise de imagens constituído de um software Image Pró-plus 4.0 (Media Cybernects), câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com objetiva de 10x. Foram analisadas as áreas de 375 fibras por animal, assim escolhidos: 15 fibras por área, sendo

5 áreas por corte, num total de 5 cortes por animal. Utilizou-se de um retículo quadriculado para a escolha de 15 fibras por corte, aleatoriamente, que coincidiam com as interseções de retas.

Para a análise da densidade do tecido conjuntivo intramuscular foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos<sup>(12)</sup> e a quantificação foi realizada por meio de um retículo com quadrados de 2500µm<sup>2</sup> contendo 56 interseções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímísio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal, perfazendo um total de 1400 pontos por animal. A área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada dividindo-se a soma do número de pontos coincidentes nas interseções de reta sobre o tecido conjuntivo (endomísio e perímísio) pelo número total de pontos.

A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Após a observação que as variáveis contemplaram a metodologia paramétrica, foi utilizado a ANOVA e teste F sendo que, quando a diferença apresentada foi significativa, aplicou-se o teste de Tukey HSD para as comparações múltiplas. Para todos os cálculos, foi estabelecido um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Com relação a massa, não foi observado alteração significativa nos grupos EE-3 e EE-7 quando comparados ao C, porém ocorreu aumento (p<0,05) no EE-15 de 11,55% comparado ao C. Além disso, EE-15 apresentou aumento (p<0,05) em relação ao EE-3, bem como ao EE-7, de 9,53% e 8,93%, respectivamente, sendo que o EE-3 não se diferiu significativamente do EE-7.

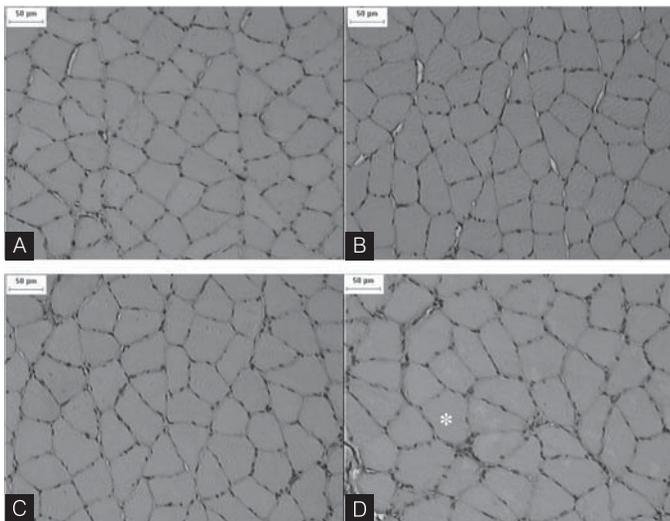
O conteúdo de glicogênio muscular não apresentou alterações significativas no EE-3 quando comparado ao C. Já o EE-7 e EE-15 demonstraram aumento (p<0,05) de 74,19% e 80,64%, respectivamente, comparados ao C, destacando que os mesmos não se diferiram significativamente.

Na análise morfométrica, os grupos EE-3 e EE-7 não apresentaram alterações significativas na área das fibras musculares quando comparados ao C, sendo que no EE-15 ocorreu aumento (p<0,05) de 16,23% em relação ao C. Além disso, o EE-15 apresentou aumento (p<0,05) de 20,78% quando comparado ao EE-3 e de 14,94% ao EE-7, destacando que o EE-3 não demonstrou diferença significativa ao EE-7.

A densidade do tecido conjuntivo intramuscular não apresentou alterações significativas em todos os grupos submetidos à EE quando comparados com o C, bem como aos grupos submetidos à intervenção. Todos os valores podem ser observados na Tabela 1 e Figura 1.

	C	EE-3	EE-7	EE-15
Massa (mg)	124,6±5	126,9±5,1	127,6±3,9	139±4,8*†#
Área (µm <sup>2</sup> )	2574±560	2478±351	2603±350	2992±273*†#
Conjuntivo (%)	8,82±3,55	7,78±3,47	9,33±4,95	8,97±5,12
Glicogênio (mg/100mg)	0,31±0,03	0,36±0,05	0,54 ± 0,04*#	0,56±0,03*†#

**Tabela 1.** Média±dpm da massa do músculo sóleo (mg), área das fibras musculares (µm<sup>2</sup>), densidade de área do tecido conjuntivo (%), conteúdo de glicogênio (mg/100mg) dos grupos controle (C), EE por 3 dias (EE-3), 7 dias (EE-7) e 15 dias (EE-15). n=5, p<0,05, \* comparado ao controle, † comparado ao EE-7, # comparado ao EE-3.



**Figura 1.** Fibras do músculo sóleo dos grupos controle (A), EE durante 3 dias (B), EE durante 7 dias (C) e EE durante 15 dias (D). Observar o aumento da área das fibras musculares (asterisco, em relação ao grupo controle).

## DISCUSSÃO

Vários trabalhos foram realizados demonstrando a eficácia da EE em promover alterações no sistema músculo esquelético, tais como transição das fibras musculares, aumento da resistência à fadiga, da densidade e perfusão dos capilares, conteúdo de mioglobinas, células satélites, da captação da glicose, bem como redução da sua tensão tetânica<sup>(6,9)</sup>. Entretanto, a forma de estimulação nesses estudos não mimetiza a prática clínica, já que foram utilizados protocolos com eletrodos implantados por um período de semanas e até meses, inviabilizando sua aplicação em humanos.

No presente trabalho, o protocolo com curtos períodos de aplicação e eletrodos de superfície contempla a prática clínica. Nessa condição experimental, foi observado que a EE promoveu aumento do conteúdo de glicogênio no músculo sóleo no sétimo dia, além do aumento da sua massa, área das fibras e glicogênio no décimo quinto dia. Tal fato demonstra a inter-relação da atividade contrátil com a homeostasia energética e a morfologia da fibra muscular, apontando para o quadro de hipertrofia muscular.

Alguns trabalhos demonstraram resultantes semelhantes, porém com utilização de estimulação crônica e ou uso de eletrodos implantados. Egginton e Hudlick<sup>(13)</sup> utilizaram a EE (10 Hz, 8 horas/dia) durante 3 dias em ratos, aplicada com eletrodo implantado no nervo fibular, observaram aumento de 12% na massa do músculo tibial anterior, além de aumento do fluxo sanguíneo.

Na mesma linha, Atherton et al.<sup>(9)</sup> demonstraram que o recurso, utilizado com frequência de 100 Hz,  $T_{ON}$  3s,  $T_{OFF}$  10s, durante 20 minutos, com eletrodos implantados, promoveu aumento significativo da síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas avaliadas após 3 horas de estimulação nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos de ratos.

Apesar da escassez de trabalhos sobre a EE com curtos períodos, bem como eletrodos de superfície, Noronha et al.<sup>(12)</sup> analisaram os efeitos da EE no músculo tibial anterior de ratos (frequência 52 Hz,  $T_{ON}$  10s,  $T_{OFF}$  10s e subida de 2s), após 8 semanas, 3 vezes por semana, com 20 contrações em cada sessão, em dias alternados, respeitando os finais de semana. Os autores não observaram hipertrofia muscular ou transformações no tipo de fibra.

Os resultados apresentados no presente estudo diferem dos encontrados por Noronha et al.<sup>(12)</sup>, apesar dos dois trabalhos utilizarem a EE por curtos períodos e eletrodos de superfície. Esse fato se justifica pela diferença nos parâmetros da corrente, bem como no tipo de contração eliciada eletricamente. Possivelmente,

o grande número de contrações não tetânicas (12000 por sessão) foi suficiente para promover alterações morfológicas e metabólicas no músculo sóleo, fato não observado no trabalho citado, que utilizou um total de 480 contrações tetânicas de 10 segundos cada. Outra diferença está na frequência utilizada, já que a frequência de 10 Hz despolariza seletivamente os motoneurônios das fibras musculares do tipo I.

A hipertrofia muscular observada nesse estudo, caracterizada pelo aumento da massa muscular e área das fibras do sóleo durante 15 dias de EE, pode ser explicada pelo fato de que esse estímulo ativa uma cascata de eventos que se caracteriza na transdução de um sinal ainda desconhecido, que regulam a expressão de fatores específicos do crescimento do músculo tais como IGF-1, fator de crescimento mecânico (MGF), bem como a miostatina. Dessa forma, alguns trabalhos demonstraram que a EE promove aumento da síntese de proteínas intramusculares, resultando em hipertrofia muscular<sup>(9,14,15)</sup>.

A importância dos estudos que avaliam o conteúdo muscular de glicogênio se fundamenta nas relações diretas entre estas reservas e a capacidade aeróbica ou de desempenho do organismo, de forma que as alterações no perfil enzimático e nas reservas glicogênicas são responsáveis pela redução da eficiência muscular, assim como o desenvolvimento do estado de exaustão<sup>(16)</sup>.

Nesse contexto, a EE também promoveu elevação nas reservas de glicogênio nos períodos de 7 e 15 dias. Tal fato pode ser justificado pela maior captação de glicose pela população de GLUT4, insensível à insulina, que são externalizados, e decorre, ainda, da ativação dos sistemas enzimáticos citosólicos na glicogênese<sup>(17)</sup>. Certamente, a EE promove elevação na atividade contrátil das fibras musculares, desse modo a dinâmica de captação e metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares são aumentadas<sup>(18)</sup>.

Etgen et al.<sup>(7)</sup> avaliaram o conteúdo de GLUT4 no músculo plantar de ratos após EE crônica, e verificaram aumento de 82% em seu conteúdo. Períodos maiores de EE, 30 a 40 e 60 a 90 dias, mostraram somente tendência ao aumento no conteúdo do GLUT4, atingindo um platô em torno de 30 a 40 dias. Um resultado importante do estudo de Hamada et al.<sup>(19)</sup> foi que a captação de glicose corporal em ratos é agudamente aumentada em resposta a 20 minutos de EE e este aumento perdura por pelo menos 90 minutos após a finalização da utilização do recurso.

Apesar das análises desse estudo demonstrar alterações tanto morfológicas, como metabólicas, não foram realizadas avaliações funcionais no músculo sóleo, como por exemplo, da força muscular, para observar se houve alguma alteração no padrão de recrutamento das unidades motoras que por sua vez também apresenta influência na força contrátil.

Além disso, considerações devem ser feitas com relação às diversas pesquisas que demonstram falhas na descrição dos parâmetros metodológicos utilizados na EE. Para Robison e Snyder<sup>(20)</sup>, existem falhas nas descrições dos métodos, já que muitos estudos não registram completamente detalhes experimentais importantes, tais como parâmetros de treinamento e características físicas da corrente. Porém, nos últimos anos tem ocorrido um maior controle de variáveis e uma maior uniformidade dos métodos de pesquisa. Dessa forma, torna-se extremamente importante a padronização dos estudos que envolvem a EE para possibilitar a reprodutibilidade, bem como comparações entre os diversos trabalhos.

## CONCLUSÃO

A EE promoveu aumento das reservas de glicogênio no músculo sóleo de ratos durante 7 dias, bem como aumento na sua massa muscular, área das fibras, e nas reservas de glicogênio no período de 15 dias. Desse modo, destaca-se a importância da intervenção utilizando-se da EE, com objetivo de promover hipertrofia muscular, demonstrando a inter-relação da atividade contrátil com a homeostasia energética, bem como com a morfologia da fibra.

## REFERÊNCIAS

1. Kramer J, Mendryk SW. Electrical stimulation as a strength improvement technique. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1982; 4:91-8.
2. Guirro R, Nunes CV, Davini R. Comparação dos efeitos de dois protocolos de estimulação elétrica neuromuscular sobre a força muscular isométrica do quadríceps. *Rev Fisioter Univ São Paulo.* 2000; 7:10-5.
3. Bax L, Staes F, Verhagen A. Does neuromuscular electrical stimulation strengthen the quadriceps femoris? A systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med.* 2005; 35:191-212.
4. Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc.* 1996; 28:1463-9.
5. Putman CT, Dusterhoft S, Pette D. Changes in satellite cell content and myosin isoforms in low-frequency stimulated fast muscle of hypothyroid rat. *J Appl Physiol.* 1999; 86:40-51.
6. Pette D, Vrbova G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve.* 1999; 22:666-77.
7. Etgen GJ, Farrar RP, Ivy JL. Effect of chronic electrical stimulation on GLUT 4 protein content in fast-twitch muscle. *Am J Physiol.* 1993; 264:816-19.
8. Noronha MA, Camargo LC, Minamoto VB, Castro C, Salvini TF. . Papel da estimulação elétrica funcional (FES) no tibial anterior de rato. *Rev Bras Fisioter.* 1997; 2:71-6.
9. Atherton PJ, Babraj JA, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 or PKB-TSC2- mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J.* 2005; 19:786-8.
10. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.
11. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 1970; 28:234-6.
12. Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc.* 1981; 121(Pt 1):75-88.
13. Egginton S, Hudlická O. Early changes in performance, blood flow and capillary fine structure in rat fast muscles induced by electrical stimulation. *J Physiol.* 1999; 515(Pt 1):265-75.
14. Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 1996; 17:487-95.
15. Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Control of the size of the human muscle mass. *Annu Rev Physiol.* 2004; 66:799-828.
16. Shulman RG, Rothman DL. The "glycogen shunt" in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:457-61.
17. Goodyear LJ, Hirshman MF, Valyou PM, Horton ES. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes.* 1992; 41:1091-9.
18. Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Silva HC, Tanno AP, Rodrigues D. Efeito da meftormina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo sóleo normal e denervado. *Rev Bras Fisiot.* 1999; 3:55-60.
19. Hamada T, Sasaki H, Hayashi T, Moritani T, Nakao K. Enhancement of whole body glucose uptake during and after human skeletal muscle lowfrequency electrical stimulation. *J Appl Physiol.* 2003; 94:2107-12.
20. Robinson JA, Snyder ML. *Eletrofisiologia clínica; Eletroterapia e teste eletrofisiológico.* 2a.ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.